Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. D. Plester

Systematische Untersuchung zur Erstellung einer Bestimmungsmethode für unspezifische Esterase im Bereich von Mikro-Units durch Densitometrie von Formazanen auf Cellulose-Acetat-Folien

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
CLAUDIA BINDER geb. Strifler
aus Stuttgart

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546526_0003

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. D. Plester

Systematische Untersuchung zur Erstellung einer Bestimmungsmethode für unspezifische Esterase im Bereich von Mikro-Units durch Densitometrie von Formazanen auf Cellulose-Acetat-Folien

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
CLAUDIA BINDER geb. Strifler
aus Stuttgart

1985

Dekan:	Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Plester
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. W. Lisch

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden	7
2.1 Die Entwicklung der Methode	7
2.1.1 Allgemeine Beschreibung der Technik	7
2.1.2 Variationen der Versuchsanordnung	8
2.1.2.1 Das Substrat	8
2.1.2.2 Der Farbstoff	9
2.1.2.3 Die Substrat- und Farbstoffmenge	10
2.1.2.4 Der pH-Wert	10
2.1.2.5 Die Probevolumina	10
2.1.2.6 Die Cellulose-Acetat-Folien	11
2.1.2.7 Kofaktoren	11
2.1.3 Die Esterase-Standardverdünnungsreihe	11
2.1.3.1 Die Alterung der Verdünnungsreihe	11
2.1.3.2 Photometrische Kontrolle der Genauigkeit der Verdünnungsreihe	12
2.1.3.3 Abhängigkeit der Esterase-Reaktion von der Inkubationszeit	12
2.1.4 Densitometrische Auswertung der Folien	13
2.1.4.1 Ermittlung der für die Messung optimalen Filterkombination	13
2.1.4.2 Berechnung der Eichkurve	14
2.2 Anwendung der Methode	14
2.2.1 Proben	14
2.2.2 Bestimmungen	14

2.2.2.1 Simultane quantitative Bestimmung von Natrium und Kalium 15
2.2.2.2 Quantitative Bestimmung von Gesamtprotein 15
2.2.2.3 Nachweis unspezifischer Esterase 15

3. Ergebnisse 16
3.1 Zur Entwicklung der Methode 16
3.1.1 Die verschiedenen Substrate 16
3.1.2 Die verschiedenen Farbstoffe 16
3.1.2.1 Fast Garnet GBC 16
3.1.2.2 Hexazonium-Pararosanilin 17
3.1.3 Verschiedene Substrat- und Farbstoffmengen 17
3.1.4 Reaktionen bei verschiedenen pH-Werten 18
3.1.5 Verschiedene Probevolumina 18
3.1.6 Verschiedene Folien 19
3.1.7 Kofaktoren 19
3.2 Zur Esterase- Standardverdünnungsreihe 19
3.2.1 Kontrolle der Alterung 19
3.2.2 Zusammenhang zwischen Farbstoffentwicklung und eingesetzter Enzymkonzentration im Küvettentest 20
3.2.3 Ermittlung der optimalen Inkubationszeit 21
3.3 Zur Auswertung mit dem Quantimet 720 D 21
3.3.1 Ermittlung der optimalen Filterkombination 21
3.3.2 Berechnung der Eichkurve 23
3.4 Ergebnisse aus der Perilymphe von acht Meerschweinchenohren 24
3.4.1 Kontrolle der Kontamination 24
3.4.2 Esterasenachweis 24

4. Diskussion der Ergebnisse 25
4.1 Entwicklung der Methode 25

4.2 Die Standardverdünnungsreihe 27
4.3 Die Eichkurve 29
4.4 Überlegungen zur Anwendung der Methode 32

5. Zusammenfassung 36

6. Literaturverzeichnis 37

7. Anhang 42

1. Einleitung und Problemstellung

Im Gegensatz zu allen anderen Körperflüssigkeiten sind über die Flüssigkeiten des Innenohres bei Mensch und Tier trotz langjähriger Forschung noch immer sehr wenig gesicherte quantitative Daten bekannt.

Ein wichtiger Grund dafür ist die unzugängliche Lage des Innenohres. Da sich die Konzentrationen von Elektrolyten, Enzymen und Proteinen in post mortem entnommenen Proben deutlich verändern (SILVERSTEIN 1966; PALVA et al. 1971; KLEINSCHMIDT und VICK 1976), sollten die Proben intra vitam entnommen werden. Die Anwendung invasiver Methoden allein zu diagnostischen Zwecken verbietet sich jedoch besonders beim Menschen von selbst. Ebenso die Entnahme von Endolymphe, da sie eine Verletzung des Ductus cochlearis und eine Schädigung des Hörorgans mit sich bringt. Die Möglichkeiten, intra vitam menschliche Innenohrflüssigkeiten zu entnehmen, beschränken sich daher auf die Absaugung von Perilymphe während Stapes-Operationen bei Otosklerosekranken. Dies hat den Nachteil, daß keine normalen Vergleichskollektive vorhanden und statistisch auswertbare Untersuchungen - z.B. im Hinblick auf die Ätiologie der Otosklerose - kaum durchführbar sind.

Eine weitere Schwierigkeit, mit der sich die Innenohrforschung auseinanderzusetzen hat, ist das geringe Probevolumen. Während Blut, Serum, Liquor cerebrospinalis etc. in ausreichender Menge zur Verfügung stehen und die zu untersuchenden Substanzen darin in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorliegen, sind das Volumen z.B. der Perilymphe und die einzelnen Substanzkonzentrationen so gering, daß die gängigen Methoden für eine biochemische Analyse nicht angewendet werden können.

Viele Autoren waren daher gezwungen, mit gepoolten Sammelproben zu arbeiten (CASORATI 1958; CHEVANCE et al. 1960; FRITSCH et al. 1969) oder sich auf relativ einfache Untersuchungen zu beschränken. Daß die Aussagekraft der Ergebnisse im Hinblick auf die individuelle diagnostische Verwertbarkeit durch alle diese Faktoren sehr eingeschränkt wird, braucht nicht betont zu werden.

Erst seit der Entwicklung ausreichend empfindlicher Mikromethoden ist nun auch die Analyse von Einzelproben mit befriedigender Genauigkeit möglich. Wichtige Schritte waren z.B. die flammenphotometrischen Elektrolytbestimmungen in 0.1 µl-Proben (GIEBEL und SCHEIBE 1982) sowie die Verfeinerung von Disc- und Immunelektrophorese zur qualitativen und quantitativen Auftrennung von Perilymphproteinen (FRITSCH et al. 1969; SILVERSTEIN 1971; GIEBEL und SAECHTLING 1973; SCHEIBE et al. 1976). Des weiteren die quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Bereich von 1×10^{-12} M durch Mikrovarianten dünnschichtchromatographischer Techniken (GIEBEL 1975) und die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes im Bereich von 0.06 - 1 µg (GIEBEL und KEPPELER 1977).

Zusammenfassende Tabellen der bekannten Daten vom Menschen finden sich bei RAUCH (1964), RAUCH und PLESTER (1965), SILVERSTEIN (1972 und 1976), vergleichende Tabellen von verschiedenen Tieren bei SILVERSTEIN (1976) und PETERSON et al. (1978).

Ein weiteres, nicht minder schwerwiegendes Problem bei der Analyse der Innenohrflüssigkeiten ist die Gewinnung von reinen Proben. Es kann davon ausgegangen werden, daß ein großer Teil der entnommenen Lymphen selbst bei sauberster Entnahmetechnik verunreinigt ist (FRITSCH et al. 1969; SILVERSTEIN 1976), wodurch Elektrolyt-, Protein- und besonders Enzymkonzentrationen stark verfälscht werden können.

Nach SCHINDLER und Mitarbeitern (1966) sind bei der Verunreinigung der Proben hauptsächlich Beimengungen folgender Körperflüssigkeiten zu berücksichtigen:

1. Blut (Vollblut, Erythrocyten oder Serum)
2. Gewebsflüssigkeit
3. Liquor cerebrospinalis
   (besonders beim Meerschweinchen durch den offenen Aquaeductus cochleae)

Daraus ergibt sich, daß die bisherigen Methoden, die lediglich die Blutbeimengung durch Zählung der Erythrocyten (KLEINSCHMIDT und VICK 1976) oder durch Messung der Absorption des freien Hämoglobins zu bestimmen versuchten, nur näherungsweise ein Maß für die Verunreinigung liefern. Die Kontamination mit Serum, nachströmendem Liquor und Gewebsflüssigkeit wird dabei nicht berücksichtigt. Die Anwendung von Korrekturfaktoren und sogenannten "contamination charts" (SILVERSTEIN 1976) scheint demnach keine Lösung des Problems zu sein.

Schon seit den Untersuchungen von WULLSTEIN und Mitarbeitern (1960), RAUCH und PLESTER (1965) und SCHINDLER et al. (1966) ist bekannt, daß sich die Elektrolyt- und Proteinwerte in den Innenohrflüssigkeiten je nach Kontamination mit Vollblut, hämolysiertem Blut, Serum, Liquor etc. in spezifischer Weise erhöhen oder erniedrigen. PETERSON und Mitarbeiter konnten 1978 zeigen, daß der Quotient aus Natriumkonzentration und Kaliumkonzentration ein sehr empfindlicher Anzeiger von Verunreinigungen ist. Mit der obengenannten Methode zur Gesamtproteinbestimmung und der verfeinerten simultanen Flammenphotometrie von Natrium und Kalium liegen nun auch spezifische Techniken vor, die eine Verwertung dieser Ergebnisse für die Kontrolle der Kontamination ermöglichen. Das dafür benötigte Probevolumen ist so gering, daß z.B. die Perilymphe bei Entnahme von durchschnittlich 3 - 5 µl pro Ohr auch für weiterführende Untersuchungen ausreicht.

Von besonderem Interesse im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der biochemischen Parameter in den Innenohrflüssigkeiten - speziell der Perilymphe - im Hinblick auf Zusammenhänge zu Erkrankungen des Ohres wie z.B. der Otosklerose.

Die Otosklerose ist in erster Linie eine Knochenerkrankung, die auf einer spezifischen herdförmigen oder diffusen Veränderung des Labyrinthknochens beruht. Mit einer Häufigkeit von 70 - 80% wird die Gegend der Steigbügelfußplatte befallen, wobei es zur Ankylose des Steigbügels und zur klassischen Symptomatik der fortschreitenden Schalleitungsstörung kommt. Daneben wird jedoch auch ein seltener Typ reiner Innenohrschwerhörigkeit beobachtet. Wie die spezifischen morphologischen Veränderungen am besten mit der Innenohrschwerhörigkeit in Einklang zu bringen sind, wird sehr unterschiedlich diskutiert.

SCHUKNECHT und GROSS (1966) sowie CAUSSE et al. (1974) gelangten zum Ergebnis, daß nur eine sehr kleine Gruppe von Innenohrschwerhörigkeiten bei Otosklerose durch direkte otosklerotische Knochentransformation mit Zerstörung der Cochlea-Struktur verursacht wird. Es muß also ein anderer Faktor gefunden werden, um den cochleären Typ der Otosklerose zu erklären. Schon 1899 erörterte SIEBENMANN eine chemische Alteration als Ursache der Schädigung des Corti-Organs. ARDOUIN und WEGMANN (1961) und ALTMANN und Mitarbeiter (1966) schlossen sich aufgrund ihrer Untersuchungen dieser Arbeitshypothese an. Das umfassendste Konzept erarbeiteten CHEVANCE et al. 1972 mit ihrer Theorie der "maladie lysosomale, cellulaire et enzymatique". Sie führen die Innenohrschädigung auf die toxische Wirkung lysosomaler Enzyme zurück, die in den otosklerotischen Umbauherden freigesetzt werden und von dort in die Perilymphe gelangen.

Gestützt wird diese Theorie durch das elektronenmikro-

skopisch gesicherte reiche Vorkommen von lysosomenhaltigen Histiocyten in den otosklerotischen Mikrofoci (CAUSSE et al. 1977; BRETLAU 1971; CHEVANCE et al. 1972; LIM und SAUNDERS 1975). ARNOLD beobachtete 1976 die Ausstoßung von Lysosomenpaketen in den perizellulären Raum, der nach Durchbruch des Prozesses in die endostale Schicht in unmittelbarer Beziehung zum Perilymphraum steht (ARNOLD und PLESTER 1977).

Im Einklang mit diesen Studien stehen Befunde anderer Autoren, die sich mit dem Nachweis lysosomaler Enzyme in der Perilymphe befaßten. So beschrieben WULLSTEIN und Mitarbeiter schon 1960 das Vorkommen Alkalischer Phosphatase in der Perilymphe operierter Otosklerose-Patienten, was von RUEDI et al. 1965 bestätigt werden konnte. Der unspezifische Nachweis hydrolytischer Aktivität erfolgte 1972 durch CHEVANCE et al. und CAUSSE und Mitarbeiter konnten 1974 durch Mikroelektrophorese Saure Phosphatase, α_1-Chymotrypsin, Kollagenase und Ribonuklease identifizieren. Die quantitative Bestimmung von Trypsin und α_1-Antitrypsin erfolgte 1976 durch CHEVANCE et al.

Ausgehend von der Theorie der "maladie lysosomale, cellulaire et enzymatique" befaßt sich die vorliegende Arbeit mit dem Nachweis hydrolytischer Enzyme in den Innenohrflüssigkeiten. Aus der Gesamtheit der über vierzig bereits beschriebenen lysosomalen Enzyme (KUCHARZ und DROŻDŻ 1977) gilt unser besonderes Interesse den Esterasen.

Sie bilden eine uneinheitliche Gruppe von Enzymen, die Ester von Carboxylsäuren und aliphatischen sowie aromatischen Alkoholen hydrolysieren. Nach der internationalen Enzym-Nomenklatur werden sie unterteilt in Lipasen (EC 3.1.1.3), die hauptsächlich Ester langkettiger Fettsäuren spalten, und Esterasen für kurzkettige Carboxylsäuren. Dazu gehören die Carboxylesterase (EC 3.1.1.6) und die

Cholinesterasen, bei denen noch zwischen Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) und Cholinesterase (EC 3.1.1.8) unterschieden wird.

In vielen Untersuchungen (GOMORI 1952; URIEL 1963; CHOUDHURY 1972) hat sich der Wert dieser Klassifikation auf biochemischer Grundlage jedoch als zweifelhaft erwiesen. Sowohl die Substrat- als auch die Inhibitorspezifitäten der einzelnen Esterasen sind mehr relativ als absolut und eine genauere Unterteilung wegen der zahlreichen Überlappungen wohl nur auf immunologischer Basis möglich.

Ein biochemischer Differenzierungsversuch erscheint demnach wenig sinnvoll, und unsere Untersuchung soll sich auf den globalen Nachweis unspezifischer Esterase-Aktivität beschränken. Das Ziel ist die Entwicklung einer genügend empfindlichen und bei genügend kleinen Probevolumina anwendbaren Mikromethode, um in einer durchschnittlichen Perilymphprobe von ca. 3 - 5 µl neben exakten quantitativen Enzymbestimmungen auch eine Kontrolle der Kontamination anhand der obengenannten Methoden durchführen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Die Entwicklung der Methode

2.1.1 Allgemeine Beschreibung der Technik

In einem Inkubationsmedium, das sowohl das gelöste Substrat als auch den Farbstoff für den Esterasenachweis enthielt, wurden Cellulose-Acetat-Folien zwei Minuten eingeweicht, danach auf einen Spanner aufgezogen und getrocknet. Mit einer 1 µl-Spritze (Hamilton, Den Haag, Holland) wurden jeweils 0.4 µl der zu bestimmenden Enzymlösung aufgetragen, jede Probe dreimal. Um das Eintrocknen der Enzymlösung während der Inkubationszeit der Reaktion zu verhindern, arbeiteten wir in einer feuchten Kammer. Sie bestand aus einem geschlossenen Glasgefäß, dessen Boden mit 35°C warmem Leitungswasser bedeckt war. Der Plexiglasdeckel war mit Bohrungen für das Auftragen des Enzyms versehen, durch welche die Hamiltonspritze mit Hilfe eines Mikromanipulators eingeführt werden konnte. Fünf Minuten vor Beginn des Auftrags wurden die Folien in die Kammer eingelegt, um eine gleichmäßige Durchfeuchtung zu erreichen. Dadurch wird ein Abperlen der Enzymlösung vermieden. Nach jeder Probe oder vor Beginn einer neuen Konzentrationsstufe der Standardverdünnungsreihe spülten wir die Spritze sorgfältig mit Ampuwa (Fresenius, Bad Homburg). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Auftragen von 5%-Formalin-Lösung mit einer gesonderten Hamiltonspritze abgestoppt. Am Ende jedes Versuches erfolgte eine gründliche Reinigung der Enzymspritze mit 96%-Äthanol und Ampuwa, wobei darauf geachtet werden muß, daß keine Alkoholrückstände in der Spritze verbleiben. Zur Aufhellung der Folien verwendeten wir nach GIEBEL (1981) Paraffinum liquidum. Die Folien müssen

dazu allerdings völlig trocken sein, da Wasserrückstände zu einer fleckigen Trübung führen. Danach wurden die Folien zwischen zwei Objektträger eingeschlossen.

2.1.2 Variationen der Versuchsanordnung

Um eine Technik mit größtmöglicher Empfindlichkeit bei kleinstmöglichem Probevolumen zu entwickeln, führten wir Versuche mit systematischer Veränderung der einzelnen Faktoren durch. Verändert wurden:

2.1.2.1 Das Substrat

Nach GOMORI (1952) und URIEL (1963) sind die einfachsten histochemischen Substrate für Esterasen die Acetate von Naphtholen, besonders die α- und β-Naphthole und die Naphthol-AS-Reihe. In Gegenwart von Diazoniumsalzen liefert das enzymatisch befreite Naphthol einen intensiv gefärbten, unlöslichen Azofarbstoff. Unsere Technik stellt die gleichen Bedingungen an die chemische Charakterisierung wie histochemische Studien: Die Produkte der Reaktion sollten unlöslich und gut gefärbt sein, um eine präzise Lokalisation zu erlauben.

Daher begannen wir unsere Versuche mit einer modifizierten Methode nach BURSTONE (1957): Die Substratlösung bestand aus 4 mg Naphthol-AS-D-Acetat (Serva, Heidelberg), gelöst in 1 ml Aceton und 1 ml Propylenglykol, in 8 ml 1/15 M Sörensen-Phosphatpuffer pH 6.5. Für die Färbelösung lösten wir 10 mg Fast Blue B (Serva, Heidelberg) in 1 ml Dimethylformamid (DMFA). Nach dem Zusammengeben und Filtrieren der beiden Lösungen wurden die Folien wie oben beschrieben mit diesem Medium behandelt.

Aus der Naphthol-AS-Reihe testeten wir auch Naphthol-AS-TR-Acetat (4 mg Naphthol-AS-TR-Acetat in 0.5 ml Aceton, 0.5 ml Propandiol und 4 ml Phosphatpuffer) sowie Naphthol-

AS-D-Chloroacetat (ebenfalls 4 mg in 0.5 ml Aceton, 0.5 ml Propandiol und 4 ml Phosphatpuffer), beide mit Fast Blue B wie oben.

CHOUDHURY beschreibt in seinen Untersuchungen von 1972, daß eine Esterase-Species, die fähig ist, einen Ester mit gegebener Kettenlänge zu spalten, immer auch korrespondierende Ester mit kürzerer Kettenlänge spalten kann, aber nicht vice versa. Ausgehend von der Tatsache, daß die unspezifische Esterase ein Gemisch verschiedenster Esterasen darstellt, müßten daher kürzestkettige Naphthol-Ester die am wenigsten spezifischen und gleichzeitig die empfindlichsten Substrate sein, da durch sie die größte Anzahl an Esterasen erfaßt wird. Diese Überlegungen werden durch die Ergebnisse von URIEL (1963) gestützt.

Nach GOMORI und CHESSICK (1953), die beim Vergleich von α- mit β-Naphthyl-Acetat beim letzteren zwar gleiche Empfindlichkeit aber unschärfere Lokalisationen fanden, entschieden wir uns für α-Naphthyl-Acetat. In einem modifizierten Ansatz nach GOMORI (1952) lösten wir 5 mg α-Naphthyl-Acetat in 0.5 ml Aceton und 4.5 ml 1/15 M Sörensen-Phosphatpuffer pH 6.5 . Die Herstellung der Färbelösung (Fast Blue B) und die Inkubation der Folien erfolgte wie oben beschrieben.

Um die Spezifität der Reaktionen zu belegen, wurden bei allen diesen Methoden auch Inkubationsansätze ohne Substrat mitgeführt.

2.1.2.2 Der Farbstoff

Alle zunächst mit Fast Blue B kombinierten obengenannten Substratlösungen versetzten wir dann mit einer Färbelösung aus 10 mg Fast Garnet GBC (Serva, Heidelberg) in 0.5 ml DMFA. Die so erhaltenen Inkubationsmedien müssen sorgfältig gefiltert werden, da sonst die Folien wegen ihrer

grobfleckigen Untergrundfärbung nicht auswertbar sind.

Außerdem untersuchten wir auch eine von BARKA 1960 für Saure Phosphatase beschriebene Methode auf ihre Anwendbarkeit für den Esterasenachweis auf Cellulose-Acetat-Folien. Das Inkubationsmedium wurde wie folgt hergestellt: Lösung A (Substratlösung) enthält 5 mg α-Naphthyl-Acetat in 0.5 ml Aceton und 4.5 ml Phosphatpuffer pH 6.5 . Lösung B besteht aus 1 g Pararosanilin in 25 ml 2N HCl, Lösung C aus 25 ml 4%-Natrium-Nitrit. 0.8 ml Lösung B und 0.8 ml Lösung C ergeben zusammen 1.6 ml Diazoniumsalzlösung, deren pH mit NaOH auf 6.5 eingerichtet werden muß. Zum Schluß werden die Salzlösung und 5ml der Lösung A in 13 ml Aqua dest. zusammengegeben.

2.1.2.3 Die Substrat- und Farbstoffmenge

Die ursprünglich eingesetzte Menge der aufgezählten Substrate und Farbstoffe wurde in getrennten Versuchsreihen zunächst einzeln, später zusammen halbiert, verdoppelt und verdreifacht.

2.1.2.4 Der pH-Wert

Die Reaktionen wurden mit verschieden eingestelltem Phosphatpuffer durchgeführt, dessen pH-Wert um maximal -1 bzw. +1.5 vom pH-Optimum der unspezifischen Esterase (pH 6.5) abwich.

2.1.2.5 Die Probevolumina

Untersucht wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Abhängigkeit vom aufgetragenen Volumen. Dazu wurden jeweils Mehrfachbestimmungen von 0.2, 0.4 und 0.6 µl einer Esteraseverdünnungsreihe vorgenommen und die Ergebnisse

verglichen.

2.1.2.6 Die Cellulose-Acetat-Folien

Die Reaktionen für alle beschriebenen Substrate und Farbstoffe außer Hexazonium-Pararosanilin wurden sowohl auf Folien von Boscamp, Hersel, als auch auf Folien von Sartorius, Göttingen, durchgeführt.

2.1.2.7 Kofaktoren

Nach PALVA et al. (1971) verglichen wir Ansätze mit und ohne Zugabe von 0.25 ml 1%-$CaCl_2$-Lösung, die als Kofaktor der Esterasereaktion gilt.

2.1.3 Die Esterase-Standardverdünnungsreihe

Zur Testung der Empfindlichkeit und der Linearität der verschiedenen Methoden verwendeten wir für alle Reaktionen eine Verdünnungsreihe von Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) aus Schweineleber von Boehringer, Mannheim. Ihre spezifische Aktivität beträgt 1 000 U/ml. Untersucht wurden die Konzentrationen 100 U/ml, 10, 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.08 und 0.01 U/ml.

2.1.3.1 Die Alterung der Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe wurde zunächst mit demselben Phosphatpuffer (1/15 M, pH 6.5) hergestellt, mit dem auch die Reaktionen selber gepuffert wurden. Sie wurde im Kühlschrank bei + 4°C gelagert. Um die Alterung der Standardreihe zu kontrollieren, bestimmten wir an drei aufeinanderfolgenden Tagen die spezifische Aktivität der Verdünnungs-

stufen 1U/ml und 0.1 U/ml mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf, Netheler und Hinz, Hamburg) bei 550 nm.

Für eine zweite Meßreihe wurde die Standardreihe in Sörensen-Phosphatpuffer pH 7.4 mit 10^{-2}-facher Pufferkapazität angesetzt und die Aktivitätsänderung ebenfalls in der Küvette über vier Stunden verfolgt.

2.1.3.2 Photometrische Kontrolle der Genauigkeit der Verdünnungsreihe

Wir überprüften zunächst die Linearität des Zusammenhangs von Farbstoffentwicklung und eingesetzter Konzentration, bzw. die Änderung von ΔE/min in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Dazu arbeiteten wir mit einem für diese Zwecke modifizierten Ansatz aus Lösung A: 5 mg α-Naphthylacetat in 0.5 ml Aceton und 4.5 ml Phosphatpuffer pH 6.5 und Lösung B: 20 mg Fast Garnet GBC in 0.5 ml DMFA. Beide Lösungen wurden getrennt mit Puffer 1:10 verdünnt, gefiltert und erst direkt vor Messungsbeginn zusammen in die Küvette gefüllt. Dadurch gelang es, die den Meßvorgang sehr störenden Ausflockungen weitgehend zu vermeiden. Die photometrische Messung erfolgte bei 550 nm. Aus den Werten berechneten wir Mittelwerte, Standardabweichungen und die Regressionsgerade.

2.1.3.3 Abhängigkeit der Esterase-Reaktion von der Inkubationszeit

Um die optimale Inkubationszeit zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe auf mit Substrat und Farbstoff präparierte Folien aufgetragen und die Reaktion wechselweise nach 3, 6, 9, 12, 15 und 20 Minuten mit 5%-Formalinlösung abgestoppt. Die gemessenen Werte wurden graphisch dargestellt und aus dem Ver-

lauf dieser Kurve die für unsere Zwecke am besten geeignete Inkubationszeit entnommen.

2.1.4 Densitometrische Auswertung der Folien

Die optische Dichte der entstandenen Azofarbstoffpunkte auf den Folien wurde mit Hilfe des Fernsehbild-Densitometers Quantimet 720 D (Cambridge Instruments, Dortmund) bestimmt. Dazu werden die aufgehellten Folien auf ein Epidiaskop unter eine Plumbicon Kamera gelegt. Eine spezielle Fernsehkamera wandelt die durch einen Lichtgriffel in beliebiger Größe wählbaren Ausschnitte in Bildpunkte um, die wiederum in vierzig Graustufen aufgelöst werden können. Die Grauwerte werden vom Gerät als Integrierte Optische Dichte (IOD) bereits digitalisiert ausgegeben. Bei sorgfältiger Eichung läßt sich mit dem Quantimet 720 D eine hohe Meßgenauigkeit erreichen, wie aus einer Arbeit von GIEBEL (1981) hervorgeht. Eine nähere Beschreibung des Eichvorganges und der übrigen technischen Details finden sich ebenfalls dort.

2.1.4.1 Ermittlung der für die Messung optimalen Filterkombination

Nach GIEBEL (1981) ist der Quantimet 720 D auch als Filterphotometer einsetzbar. Durch die Anwendung von monochromatischem Licht kann die Empfindlichkeit der Messung noch wesentlich verbessert werden.

In einem ersten Arbeitsgang bestimmten wir daher im Spektralphotometer die Absorptionskurve des beim Enzymnachweis entstehenden Azofarbstoffes. Danach untersuchten wir die optische Durchlässigkeit verschiedener Filterkombinationen (Jenaer Glaswerke, Schott und Söhne, Mainz) im Bereich des Absorptionsmaximums.

2.1.4.2 Berechnung der Eichkurve

Die mit den ermittelten Filterkombinationen im Quantimet gemessenen Werte wurden in einen Rechner vom Typ HP 98 30 (Hewlett Packard, Böblingen) eingegeben. Dieser errechnete daraus die Mittelwerte, die Standardabweichung, den Standardfehler und die lineare Regression.

2.2 Anwendung der Methode

2.2.1 Proben

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der entwickelten Methode dienten uns Proben von Perilymphe aus acht Meerschweinchenohren. Da sich befriedigend reine Proben nur bei Entnahme der Perilymphe mittels Kryostat-Technik gewinnen lassen, benutzten wir eine gefriertechnische Entnahmemethode. Eine genaue Beschreibung findet sich bei GIEBEL (1974).

Obwohl über Esterasen keine speziellen Werte vorliegen, läßt sich nach den Untersuchungen von SÜDHOF und WOTZEL (1960) vermuten, daß bei Lagerung der Proben ein Enzymaktivitätsverlust auftritt. Besonders bei sehr geringen Konzentrationen würden die Ergebnisse dadurch sehr beeinträchtigt. Wir verarbeiteten unsere Proben daher immer sofort und ohne sie länger zu lagern.

2.2.2 Bestimmungen

Zur in der Einleitung erwähnten Kontrolle der Kontamination führten wir folgende Bestimmungen durch:

2.2.2.1 Die simultane quantitative Bestimmung von Natrium und Kalium nach GIEBEL (1981)

2.2.2.2 Die quantitative Bestimmung von Gesamtprotein ebenfalls nach GIEBEL (1981)

2.2.2.3 Danach erfolgte die Bestimmung der unspezifischen Esterase mit der von uns entwickelten Methode.

Dazu wurden außer den Proben auf jeder Folie zwei Konzentrationsstufen der Standardverdünnungsreihe aufgetragen (1 U/ml und 0.1 U/ml). Das Mitführen eines internen Standards ermöglicht nach der Auswertung im Quantimet die eventuelle Einführung eines Korrekturfaktors und erhöht so die Meßgenauigkeit (GIEBEL und STRIEBEL 1977).

3. Ergebnisse

3.1 Zur Entwicklung der Methode

Als Kriterium für die Empfindlichkeit des untersuchten Inkubationsmediums verwandten wir in diesem Stadium der Arbeit die Sichtbarkeit der Azofarbstoffpunkte. Jede Reaktion, d.h. jeder Punkt, der auf der nicht aufgehellten Folie in seiner spezifischen Färbung dem bloßen Auge eben noch erkennbar war, galt als positiv. Diese Ergebnisse sind also nur grob quantitativ.

3.1.1 Die verschiedenen Substrate (Ad 2.1.2.1)

Der Ansatz Naphthol-AS-D-Acetat + Fast Blue B ergab bis zur Esterasekonzentration von 1 U/ml positive Resultate. Ebenso Naphthol-AS-D-Chloroacetat + Fast Blue B. Bei Naphthol-AS-TR-Acetat + Fast Blue B fiel der Farbstoff zum großen Teil während des Filterns aus, die Reaktion konnte daher nicht durchgeführt werden.

Für die Inkubationslösung aus α-Naphthyl-Acetat + Fast Blue B lag die Nachweisgrenze bei 0.01 U/ml.

3.1.2 Die verschiedenen Farbstoffe (Ad 2.1.2.2)

3.1.2.1 Fast Garnet GBC

Mit Naphthol-AS-D-Acetat blieb die Reaktion unverändert: Farbstoffentwicklung war bis 1 U/ml zu erkennen. Bei Naphthol-AS-D-Chloroacetat steigerte sich die Empfindlichkeit um eine Zehnerpotenz: Die Punkte waren bis zur Verdünnungsstufe 0.1 U/ml sichtbar. Die Ergebnisse von Naphthol-AS-TR-Acetat waren bis 1 U/ml positiv.

Bei Verwendung von α-Naphthyl-Acetat + Fast Garnet GBC betrug die niedrigste Esterasekonzentration, die eben noch nachgewiesen werden konnte, 0.001 U/ml.

3.1.2.2 Hexazonium-Pararosanilin

Bei Kombination von Hexazonium-Pararosanilin mit den verschiedenen Substraten der Naphthol-AS-Reihe lag die Nachweisgrenze in allen Fällen bei 0.01 U/ml. Reaktionen mit α-Naphthyl-Acetat waren bis zur Verdünnungsstufe 0.00001 U/ml oder 0.01 mU/ml positiv.

Trotz ihrer deutlich höheren Empfindlichkeit erwies sich diese Methode für unsere Zwecke jedoch nicht als geeignet. Nach der Inkubation in der Substrat-Farbstoff-Lösung sind die Cellulose-Acetat-Folien nur noch sehr wenig aufnahmefähig für in Wasser gelöste Substanzen. Die Enzymlösung perlt an der Folienoberfläche ab und schlägt an der Außenwand der Hamiltonspritze hoch, wodurch ein nicht berechenbarer Anteil des Probevolumens verlorengeht. Unsere Versuche mit sorgfältig fraktioniertem Auftrag der Proben und der Vorbehandlung der Folien mit DMFA erbrachten keine Lösung des Problems. Auch der Zusatz von Lösungsmitteln zum Inkubationsmedium war nicht möglich ohne eine gleichzeitige Abschwächung der Enzymreaktion. Wir mußten daher diese Methode wieder verlassen.

3.1.3 Verschiedene Substrat- und Farbstoffmengen (Ad 2.1.2.3)

Das Inkubationsmedium aus 5 mg α-Naphthyl-Acetat + 20 mg Fast Blue B zeigte keine Verbesserung der Ergebnisse: Die Nachweisgrenze blieb bei 0.01 U/ml. Beim Einsatz doppelter Substrat- und doppelter Farbstoffmenge (10 mg α-Naphthyl-Acetat + 20 mg Fast Blue B) erhielten wir dasselbe Resul-

tat.

Sichtbare Punkte ergaben sich mit 5 mg α-Naphthyl-Acetat und 20 mg Fast Garnet GBC bis 0.0001 U/ml, mit 5 mg α-Naphthyl-Acetat + 30 mg Fast Garnet GBC ebenfalls bis 0.0001 U/ml und mit 10 mg α-Naphthyl-Acetat + 20 mg Fast Garnet GBC bis 0.01 U/ml.

3.1.4 Reaktionen bei verschiedenen pH-Werten (Ad 2.1.2.4)

Mit steigendem pH-Wert verringert sich die Empfindlichkeit des Esterasenachweises. Während wir mit dem Inkubationsmedium 5 mg α-Naphthyl-Acetat + 30 mg Fast Garnet GBC bei pH 6.5 bis zu 0.0001 U/ml hinab positive Ergebnisse erzielen konnten, ließen sich bei steigendem pH nur noch immer höhere Konzentrationen nachweisen. Bei pH 8 lag die Nachweisgrenze bei 0.1 U/ml. Ebenso sank die Empfindlichkeit bei pH-Werten unter 6.5 . Als für unsere Methode am besten geeignet erwies sich daher pH 6.5 .

3.1.5 Verschiedene Probevolumina (Ad 2.1.2.5)

Die hierzu verwendeten Folien wurden aufgehellt und die Integrierte Optische Dichte (IOD) mit dem Quantimet 720 D bestimmt. Die genauesten und empfindlichsten Messungen waren beim Auftrag von 0.6 µl Standardlösung möglich, während wir für ein Probevolumen von 0.2 µl sichere Werte erst ab 0.1 U/ml erhielten. Da jedoch ein Auftrag von 0.6 µl bei Dreifachbestimmungen einen relativ großen Verbrauch von Innenohrflüssigkeit bedeutet, entschieden wir uns für ein Probevolumen von 0.4 µl als bestem Kompromiß zwischen hoher Empfindlichkeit der Methode und möglichst geringem Lymphenverbrauch.

3.1.6 Verschiedene Folien (Ad 2.1.2.6)

Die Nachweisgrenze aller Substrate aus der Naphthol-Gruppe, kombiniert sowohl mit Fast Blue B als auch mit Fast Garnet GBC, lag für die Cellulose-Acetat-Folien von Boscamp um eine Zehnerpotenz niedriger als auf den Folien von Sartorius.

3.1.7 Kofaktoren (Ad 2.1.2.7)

Die Zugabe von 1%-$CaCl_2$-Lösung zum Inkubationsansatz erbrachte in keinem Fall eine Änderung der Ergebnisse.

3.2 Zur Esterase-Standardverdünnungsreihe

3.2.1 Kontrolle der Alterung (Ad 2.1.3.1)

Die photometrische Bestimmung der Extinktion der mit dem 1/15 M Phosphatpuffer pH 6.5 angesetzten Verdünnungsreihe ergab folgende Werte:

	ΔE/min nach		
	0 h	24 h	48 h
1 U/ml	0.340	0.301	0.275
0.1 U/ml	0.036	0.034	0.023

- Tab. 1 -

Die Werte für die Verdünnungsreihe in Phosphatpuffer pH 7.4 mit 10^{-2}-facher Pufferkapazität lauteten:

	ΔE/min nach			
	0 h	1 h	2 h	4 h
0.7 U/ml	0.247	0.240	0.263	0.265
0.32 U/ml	0.109	0.118	0.118	0.115
0.07 U/ml	0.026	0.031	0.030	0.034

- Tab. 2 -

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, zeigt diese Verdünnungsreihe eine wesentlich konstantere Enzymaktivität. Wir verwandten daher für alle folgenden Versuche zum Ansetzen der Standardverdünnungsreihe den Phosphatpuffer pH 7.4 mit 10^{-2}-facher Pufferkapazität.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 1 und 2 im Anhang graphisch dargestellt.

3.2.2 Zusammenhang zwischen Farbstoffentwicklung und eingesetzter Enzymkonzentration im Küvettentest (Ad 2.1.3.2)

Die aus jeweils drei Messungen errechneten Mittelwerte der Extinktion und deren Standardabweichungen sind aus Tabelle 3 zu entnehmen.

	ΔE/min	SD	SD%
10 U/ml	3.54	0.05	1.4
1 U/ml	0.36	0.02	5.6
0.5 U/ml	0.19	0.0058	3.5
0.1 U/ml	0.032	0.0048	14.4
0.05 U/ml	0.018	0.0016	8.9
0.01 U/ml	0.0036	0.0001	2.8

- Tab. 3 -

Die Formel der dazugehörigen Regressionsgerade lautet:

$$y = 0.35\ x + 0.0031$$

Der Korrelationskoeffizient beträgt 0.99 .

Mittelwerte und Regressionsgerade sind in Abb. 3 (siehe Anhang) eingetragen. Außerdem die in zwei menschlichen Plasma-Proben, in denen keine Hämolyse sichtbar war, interessehalber gemessenen Werte.

3.2.3 Ermittlung der optimalen Inkubationszeit (Ad 2.1.3.3)

Mit dem Quantimet 720 D wurden nach Aufhellung der Folien folgende IOD-Werte gemessen (es handelt sich jeweils um Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen):

	IOD nach					
	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	20 min
1 U/ml	244.5	272.4	381.0	410.4	-	232.5
0.3 U/ml	86.0	111.0	125.0	129.0	143.0	91.3
0.1 U/ml	56.0	64.3	73.6	86.5	46.5	30.3

- Tab. 4 -

Nach diesen Ergebnissen und dem Kurvenverlauf in Abb. 4 (siehe Anhang) erwies sich eine Inkubationszeit von 12 min als für unsere Zwecke am besten geeignet.

3.3 Zur Auswertung mit dem Quantimet 720 D

3.3.1 Ermittlung der optimalen Filterkombination (Ad 2.1.4.1)

Bei der photometrischen Bestimmung der Absorptionskurve

des Azofarbstoffes erhielten wir aus nachstehenden Extinktionen die in Abbildung 5 (siehe Anhang) dargestellte Kurve.

λ	400 nm	450 nm	500 nm	530 nm	540 nm	550 nm
Δ E/min	0.05	0.75	0.84	1.05	1.09	1.11

λ	560 nm	570 nm	580 nm	590 nm	600 nm	650 nm
Δ E/min	1.10	1.09	1.08	1.04	0.99	0.60

- Tab. 5 -

Das Absorptionsmaximum liegt bei 550 nm.

Die Transmission betrug für vier verschiedene Filterkombinationen:

	BG 26 + OG 515	BG 14 + OG 515	BG 38 + OG 515	BG 38 + OG 530
500 nm	-	-	-	-
510 nm	-	8.2	1.2	-
520 nm	40.7	41.2	46.4	1.0
530 nm	58.4	55.2	62.2	29.9
540 nm	61.8	55.0	71.0	58.8
550 nm	60.0	50.5	69.9	66.2
560 nm	59.0	44.5	66.5	66.2
570 nm	55.2	38.2	61.6	62.0
580 nm	52.7	31.8	57.3	55.5
590 nm	48.7	26.7	49.4	48.8
600 nm	44.9	21.3	41.2	41.4
650 nm	30.5	7.2	10.4	10.5

- Tab. 6 - Angaben in %

Von allen ausgemessenen besitzt die Filterkombination BG 38 + OG 515 im Bereich des Absorptionsmaximums des Azofarbstoffes mit 69.9% die höchste optische Durchlässigkeit. Die Messungen am Quantimet wurden daher mit diesen beiden Filtern durchgeführt.

In den Abbildungen 5 und 6 im Anhang finden sich die Absorptionskurve des Azofarbstoffes und die Transmissionskurven der verschiedenen Filterkombinationen.

3.3.2 Berechnung der Eichkurve (Ad 2.1.4.2)

Die Mittelwerte der IOD, deren Standardabweichung und die Standardfehler sind in Tabelle 7 für eine Verdünnungsreihe von 1 U/ml bis 0.08 U/ml unspezifischer Esterase aufgeführt. Das Inkubationsmedium für die Folien bestand aus 5 mg α-Naphthyl-Acetat + 0.5 ml Aceton in 4.5 ml Puffer pH 6.5 und 30 mg Fast Garnet GBC in 0.5 ml DMFA.

	Anzahl	Integrierte Optische Dichte				
	d. Prob.	MW	SD	SD%	SE	SE%
0.08 U/ml	19	27.0	5.80	21.5	-	-
0.1 U/ml	23	44.960	7.850	17.5	-	-
0.2 U/ml	36	98.417	17.774	18.1	2.962	3.0
0.4 U/ml	35	179.686	16.417	9.1	2.775	1.5
0.6 U/ml	26	245.038	18.970	7.7	3.720	1.5
0.8 U/ml	30	297.167	19.869	6.7	3.628	1.2
1 U/ml	23	359.174	28.935	8.1	6.033	1.7

- Tab. 7 -

Bei der Berechnung der linearen Regression ergab sich für $p < 0.001$ ein Korrelationskoeffizient von + 0.98.

Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:

$$y = 350.4\ x + 22.0$$

Abbildung 7 im Anhang zeigt den Verlauf der Eichkurve.

3.4 Ergebnisse aus der Perilymphe von acht Meerschweinchenohren (Ad 2.2)

3.4.1 Kontrolle der Kontamination

Die Konzentrationen von Natrium, Kalium und Gesamtprotein befanden sich in allen Proben im Normbereich.

Probe	K^+	Na^+	Protein
1	3.1 mval/l	153.4 mval/l	128.3 mg/100 ml
2	5.4 "	151.5 "	123.9 "
3	5.8 "	141.3 "	134.3 "
4	3.3 "	157.0 "	103.0 "
5	2.0 "	146.9 "	139.6 "
6	2.2 "	146.2 "	115.7 "
7	4.9 "	140.6 "	130.2 "
8	7.3 "	155.6 "	113.2 "

- Tab. 8 -

3.4.2 Esterasenachweis

In keinem Fall konnte unspezifische Esterase nachgewiesen werden.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Entwicklung der Methode

Unsere theoretischen Überlegungen, angeregt durch eine Arbeit von CHOUDHURY (1972) über die unspezifische Esterase, sahen sich durch unsere Versuche bestätigt: Von allen untersuchten Substraten aus der Naphtholester-Gruppe erwies sich α-Naphthyl-Acetat als das am wenigsten spezifische. Es kann offenbar von den meisten Esterasen gespalten werden und liefert daher den empfindlichsten Enzymnachweis. Der entstehende Naphthol-Farbstoff-Komplex ist in den präparierten Folien relativ wenig löslich, sodaß die Esterase-Reaktionen als für unsere Zwecke ausreichend scharf abgegrenzte Farbpunkte sichtbar werden.

In der Literatur über histochemische Nachweismethoden für Esterase wird die α-Naphthyl-Acetat-Technik mit verschiedenen Diazoniumsalzen kombiniert beschrieben (GOMORI 1952), ohne daß irgendwelche Unterschiede erwähnt werden. Bei den geringen Aktivitäten, die in unseren Untersuchungen nachgewiesen wurden, beobachteten wir jedoch deutlich verschiedene Empfindlichkeiten. Für die Kombination von α-Naphthyl-Acetat mit Fast Garnet GBC lag die Nachweisgrenze um eine Zehnerpotenz niedriger als mit Fast Blue B, wir entschieden uns daher für den ersteren Farbstoff.

Die guten Ergebnisse, die wir mit Hexazonium-Pararosanilin erhielten, ließen sich für unsere Methode nicht verwerten, da es aufgrund des schon beschriebenen Abperl-Phänomens nicht möglich war, konstante Volumina aufzutragen. Im Rahmen einer anderen Technik und Versuchsanordnung könnte sich dieser Farbstoff jedoch durchaus als geeignet erweisen.

Nachdem die Kombination α-Naphthyl-Acetat + Fast Garnet GBC grundsätzlich feststand, ergab sich beim Vergleich verschiedener Farbstoff- und Substratmengen, daß sowohl mit 5mg α-Naphthyl-Acetat und 20 mg Fast Garnet GBC als auch mit 5 mg α-Naphthyl-Acetat und 30 mg Fast Garnet GBC die Bestimmung am empfindlichsten war. Es konnten mit beiden Kombinationen noch Konzentrationen von 0.0001 U/ml nachgewiesen werden. Da jedoch auf den Folien möglicherweise die Beweglichkeit der Farbstoff- wie auch der Substratmoleküle leicht behindert ist, und um sicherzugehen, daß die Reaktion auf jeden Fall im Substrat- und Farbstoffüberschuß abläuft, blieben wir für den Folientest bei 30 mg Fast Garnet GBC.

Beim Küvettentest tritt dieses Problem nicht auf. Eine höhere Farbstoffkonzentration erhöht im Gegenteil die Neigung zur Ausflockung und damit die Gefahr einer Falschmessung. Den Küvettentest führten wir daher mit 20 mg Fast Garnet GBC durch.

Als den optimalen pH-Wert für diese Methode beschrieben 1953 GOMORI und CHESSICK pH 8. Ihre Erklärung der Tatsache, daß sie bei diesem pH und nicht bei einem dem pH-Optimum der Esterase nähergelegenen die besten Resultate erzielten, war folgende: Im pH-Optimum wird das Naphthol so schnell freigesetzt, daß das Diazoniumsalz schneller verbraucht wird, als es aus der Umgebung nachdiffundieren kann. Die Reaktion kommt dadurch entweder zum Stillstand, oder das Naphthol wandert so weit in die Umgebung, bis es auf ein Farbstoffmolekül trifft. Dabei entstehen unscharfe Lokalisationen.

In unseren Versuchsreihen bei verschiedenen pH-Werten konnten wir diese Ergebnisse jedoch nicht nachvollziehen. Am besten geeignet für unsere Methode war pH 6.5, was dem pH-Optimum der Esterase entspricht. Erwägt man die spätere Anwendung unseres Esterase-Nachweises in Innen-

ohrflüssigkeiten, so wäre es vielleicht von Interesse, die Reaktion bei einem dem pH der Lymphen von 7.2 näherliegenden Wert durchführen zu können, um ein möglichst naturgetreues Modell zu erhalten. Unseres Erachtens kann jedoch dieser kleine Nachteil zugunsten der erhöhten Nachweisempfindlichkeit in Kauf genommen werden.

4.2 Die Standardverdünnungsreihe

Wie der Koeffizient von + 0.99 zeigt, besteht zwischen Farbstoffentwicklung und eingesetzter Enzymaktivität im Küvettentest eine deutlich positive Korrelation. Aus den errechneten Mittelwerten der Extinktion und deren Standardabweichung läßt sich eine ausreichende Genauigkeit ablesen.

Prinzipiell wäre also auch ein Mikroküvettentest zum Esterasenachweis denkbar. Die absoluten Aktivitäten, deren Bestimmung unser Ziel ist, liegen jedoch weit unter dem Nachweisbereich üblicher Geräte, und Mikrophotometer, die in dem für uns interessanten Volumenbereich arbeiten, sind zur Zeit im Handel nicht erhältlich.

Gut einsetzbar hingegen ist der Küvettentest zur Kontrolle der Standardverdünnungsreihe. Da selbst die kleinste Ungenauigkeit beim Pipettieren besonders bei den niedrigen Konzentrationen große Fehler verursachen kann, wurde die Aktivität jeder Stufe einer frisch hergestellten Standardreihe im Photometer dreifach bestimmt. So konnten Reihen mit gröberen Abweichungen vor Beginn des Folientests erkannt und verworfen werden.

Auch bei der endgültigen Anwendung des Esterasenachweises erscheint uns eine einmalige photometrische Kontrolle des internen Standards zu Beginn der Versuche sinnvoll. Die Standardwerte werden in ihrer Bedeutung für die

eventuelle Berechnung eines Korrekturfaktors zusätzlich abgesichert und erleichtern bei Abweichungen eine präzise Fehlerlokalisation.

Ebenso ist die Kontrolle der Alterung der Verdünnungsreihe im Photometer möglich und ratsam. Ausgehend von der Überlegung, daß die Esteraseaktivität am ehesten in einem dem intrazellulären Milieu angenäherten Medium konstant gehalten werden könnte, benutzten wir zur Verdünnung den schon beschriebenen modifizierten Phosphatpuffer. Die Enzymaktivität zeigte danach über vier Stunden hinweg keine wesentliche Änderung. Da wir jedoch durch den Küvettentest die Möglichkeit besaßen, jederzeit identische Verdünnungsreihen herzustellen, verwendeten wir die Standards nie länger als einen Tag, sondern pipettierten aus der Stammlösung eine neue Reihe.

Übertragen auf Proben unbekannter Enzymkonzentration bedeutet das, daß die Proben möglichst frisch und ungelagert verarbeitet werden sollten. Es läßt sich hierdurch gleichzeitig ein zweiter Fehler vermeiden. Durch Verdunstung kann es zu falsch erhöhten Meßwerten kommen. Die sonst als Verdunstungsschutz übliche Methode der Ölüberschichtung kommt für unsere Technik nicht in Frage, da beim Auftragen der Proben immer auch kleinste Mengen Öl auf die Folien gelangen. Die Folien sind dann an dieser Stelle nicht mehr aufnahmefähig für wässrige Lösungen, und die Reaktion wird gestört. Auch dies spricht für eine rasche Verarbeitung der Proben.

Die Inkubationszeiten, die in der Literatur für den Esterasenachweis empfohlen werden, bewegen sich zwischen 5 - 20 Minuten (GOMORI und CHESSICK 1953) und 60 - 90 Minuten (URIEL 1963). Wie aus dem Kurvenverlauf in Abbildung 4 zu ersehen ist, tritt jedoch bei unserer Methode nach ungefähr 12 bis 15 Minuten ein Abfall der Farbstoffkonzentration auf.

Dem Versuch einer Erklärung liegt die Beobachtung zugrunde, daß nach Ablauf dieser Zeit die Farbpunkte bei Betrachtung ein wenig unschärfer begrenzt erscheinen. Möglicherweise diffundiert der Naphthol-Farbstoff-Komplex, der-wie der Küvettentest beweist-nicht völlig unlöslich ist, während der Inkubationszeit nach außen. Die Integrierte Optische Dichte (IOD) wird jedoch über dem halben Spitzengrauwert des jeweiligen Farbpunktes gemessen. Moleküle, die durch ihre Wanderung unter diese Meßgrenze geraten, werden dann nicht mehr miterfaßt. Unterstützt wird diese Theorie durch unsere photometrischen Messungen entsprechender Aktivitäten. Hier war keine Verminderung der Farbstoffkonzentration zu beobachten.

4.3 Die Eichkurve

Das auffälligste Ergebnis der quantitativen Messungen am Densitometer im Vergleich zu den semiquantitativen Werten aus den Vorversuchen ist die Erhöhung der Nachweisgrenze um drei Zehnerpotenzen. Waren vorher noch Konzentrationen von 0.0001 U/ml nachweisbar, so liegt die Grenze jetzt bei 0.1 bzw. 0.08 U/ml. Für die Verminderung der Empfindlichkeit sind im wesentlichen zwei Faktoren verantwortlich:

1. Konzentrationen unter 0.08 U/ml waren nach wie vor bestimmbar. Im Gegensatz zur vorherigen bloßen optischen Einteilung in positiv und negativ zeigte sich aber nun, daß eine befriedigende quantitative Reproduzierbarkeit der Meßwerte nicht zu erreichen war. Die Streuung der Einzeldaten war so groß, daß ein linearer Zusammenhang nicht errechnet werden konnte. Dies mag einerseits daran liegen, daß wir uns in der Nähe der Nachweisgrenze des Quantimet bewegen, andererseits und hauptsächlich daran, daß bei so geringen Aktivitäten

Volumen-, Auftrags- und andere Fehler um so schwerer ins Gewicht fallen.

2. Bei der Aufhellung der Folien in Paraffin könnte es zu einem ähnlichen Vorgang kommen wie oben beschrieben. Ein Teil des Farbstoff-Komplexes könnte entweder in den hinterher abtropfenden Paraffin-Überschuß eintreten, oder es könnte das Wegdiffundieren des Farbstoffes innerhalb der Folie begünstigt werden.

Aus unserer Bestimmung des Esterasengehaltes im menschlichen Plasma läßt sich jedoch der Schluß ziehen, daß ein Meßbereich mit der unteren Begrenzung bei 0.08 U/ml durchaus hinreichend ist. Da höhere Konzentrationen als 1 U/ml ebenfalls nicht wahrscheinlich sind und außerdem durch Verdünnung in den Meßbereich einbezogen werden können, haben wir die obere Grenze bei 1 U/ml gezogen.

In die Berechnung der Eichkurve in diesen Grenzen gingen 192 Werte der IOD einer Esterase-Standardverdünnungsreihe ein. Nicht berücksichtigt wurden 27 Farbpunkte, die von vornherein als deutlich zu groß oder zu klein erkannt wurden (=Volumenfehler) und drei Folien, die insgesamt eine sehr schwache Untergrundfärbung aufwiesen. Dieser Fehler entsteht beim Filtern eines nicht ausreichend gerührten Inkubationsmediums. Der verstärkt ausfallende Farbstoff bleibt in hohem Maße im Filter zurück und verursacht eine systematisch zu geringe Farbstoffentwicklung.

Wie für den Küvettentest zeigt sich auch für den Folientest ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Farbstoffentwicklung. Die Standardabweichung der Mittelwerte, die lediglich im unteren Bereich 10 % überschreitet, kann ebenfalls als akzeptabel betrachtet werden.

Damit ergibt sich zusammenfassend folgender Ansatz für den Esterasenachweis:

1. Das Inkubationsmedium wird aus einer Substratlösung aus 5 mg α-Naphthyl-Acetat in 0.5 ml Aceton und 4.5 ml Phosphatpuffer pH 6.5 und einer Färbelösung aus 30 mg Fast Garnet GBC in 0.5 ml DMFA hergestellt.

2. Nach dem Filtrieren werden die Cellulose-Acetat-Folien zwei Minuten in diesem Medium inkubiert und dann getrocknet.

3. In der unter 2.1 beschriebenen Weise werden darauf jeweils 0.4 µl der Probe aufgetragen und die Reaktion nach 12 Minuten mit Formalin gestoppt.

4. Nach der Aufhellung erfolgt die Messung im Quantimet. Anhand des mitgeführten internen Standards kann die Lage der Werte der Folie im Verhältnis zur Eichkurve bestimmt und daraus eventuell ein Korrekturfaktor f errechnet werden:

$$f = \frac{IOD_{St(gem)} \times 100}{IOD_{St(soll)}}$$

$IOD_{St(gem)}$ = gemessener Werte der IOD des internen Standards

$IOD_{St(soll)}$ = aus der Eichkurve entnommener entsprechender Wert

Der korrigierte Wert K einer zu bestimmenden Probe beträgt demnach:

$$K = \frac{IOD_{Pr(gem)} \times 100}{f}$$

$IOD_{Pr(gem)}$ = gemessener Wert der IOD der Probe

Mit der oben dargestellten Methode ist es möglich, in 0.4 µl-Proben Esterase-Konzentrationen von 0.08 bis 1 U/ml zu bestimmen. Das entspricht einer absoluten Nachweisgrenze von 0.032 mU.

4.4 Überlegungen zur Anwendung der Methode

Die entwickelte Methode erweist sich somit für das in der Einleitung bereits skizzierte Anwendungsgebiet als sehr geeignet.

Bei unserem Vorgehen benötigen wir zur Kontrolle der Reinheit 0.1 µl für die simultane Bestimmung von Natrium und Kalium sowie 0.1 µl für die Bestimmung von Gesamtprotein. Bei Doppel- bzw. Dreifachmessungen ergibt sich eine Flüssigkeitsmenge von 0.5 µl. SILVERSTEIN, der unseren Werten am nächsten kommt, mußte 1976 immerhin noch 1.5 µl für dieselben Bestimmungen einsetzen. Die mikroskopische Untersuchung der Proben auf ihren eventuellen Gehalt an Zellen bedeutet keinen Flüssigkeitsverlust. Relativ viel Innenohrflüssigkeit verbraucht mit 3 x 0.4 µl dagegen die Esterase-Bestimmung. Betrachtet man jedoch den Gesamtverbrauch von 1.7 µl, so liegen wir damit in einem Volumenbereich, in dem bisher solche Bestimmungen nicht möglich waren. Bei einem durchschnittlichen Probevolumen von 1 - 2 µl Endolymphe und 3 - 5 µl Perilymphe stünden von letzterer sogar noch einige Mikroliter für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung. Zum Vergleich: CHEVANCE et al. benötigten 1972 für eine einzige Bestimmung der hydrolytischen Aktivität im Gelatine-Test 3 - 4 µl, PALVA und Mitarbeiter 1971 für die elektrophoretische Auftrennung der Esterasen ebenfalls mindestens 3 µl Endo- und Perilymphe.

Das geringe Volumen, das für unsere Methode ausreicht, ist jedoch nicht nur im Hinblick auf die überhaupt verfüg-

baren Mengen an Innenohrflüssigkeit von Bedeutung. Ein weiterer Vorteil liegt auch in der erhöhten Reinheit der entnommenen Proben.

Wie schon erwähnt, werden die Hauptfehler bei der Probenahme durch Beimengungen von Blut, Gewebeflüssigkeit und Liquor verursacht. Das durch den Kapillarsog beim Abpunktieren entstehende Druckgefälle begünstigt einerseits Einblutungen infolge Gefäßrupturen, andererseits den Nachstrom von Gewebsflüssigkeit und Liquor. Zwar steht beim Menschen ein Liquornachfluß weniger zu befürchten, da der Aquaeductus cochleae offensichtlich stark eingeengt ist (ALTMANN und WALTNER 1947). Dennoch bleibt durch das eventuelle Einströmen von Gewebsflüssigkeit ein nicht zu vernachlässigendes Risiko bestehen. Ebenso wie das der Blutkontamination wird es um so größer, je mehr Volumen entnommen wird. Übereinstimmend mit diesen Überlegungen erzielten PETERSON und Mitarbeiter 1978 mit den kleinsten Probevolumina (1 - 100 nl) die reinsten Ergebnisse.

Die geschilderten Vorteile des hier entwickelten Esterase-Nachweises eröffnen die Perspektive seiner Anwendung z.B. an menschlicher Perilymphe im Rahmen der schon erwähnten Otosklerose-Theorien. Ein so kleines Volumen könnte durch einen geübten Operateur im Verlauf einer Stapedektomie ohne größere Schwierigkeiten gewonnen werden. Nach den Untersuchungen von HLADKY et al. 1960 ist eine funktionelle Auswirkung auf das Gehör dabei nicht zu befürchten. Beschreibungen der Entnahmetechnik finden sich bei RAUCH und PLESTER (1965) und SILVERSTEIN (1976).

Die bisher einzigen Ergebnisse über unspezifische Esterase in der menschlichen Perilymphe sind nur qualitativ und stammen aus einer Arbeit von PALVA et al.(1971). In 31 post mortem entnommenen menschlichen Lymphproben gelang ihnen der elektrophoretische Nachweis von sechs Esterase-Fraktionen. Die drei dominierenden Fraktionen

konnten jedoch auch nach elektrophoretischer Auftrennung von hämolysiertem Blut beobachtet werden. Zwei weitere Banden wurden als post mortem freigesetzte Gewebsesterasen identifiziert.

In eine ähnliche Richtung - wenn auch nicht direkt auf den Menschen übertragbar - weisen unsere abschließenden Untersuchungen an acht Meerschweinchen-Perilymphen. In keiner der Proben, die aufgrund der Kontrollbestimmungen alle als unkontaminiert angesehen werden konnten, war unspezifische Esterase nachzuweisen.

Diese Resultate unterstreichen einerseits die Notwendigkeit der Lebendentnahme, andererseits wiederum die Bedeutung einer effektiven Kontaminationskontrolle. Eine Quantifizierung der Ergebnisse von PALVA et al., untermauert durch eine gleichzeitige Reinheitsprüfung, wäre daher sehr interessant.

Ebenso wäre an eine Anwendung im Rahmen des lysosomalen Konzepts der Otosklerose zu denken. CHEVANCE und Mitarbeiter wiesen 1972 eine erhöhte hydrolytische Aktivität in den Perilymphen Otosklerose-Kranker nach. Bei der Zuordnung zu den entsprechenden audiometrischen Befunden fanden sie eine signifikante Korrelation zwischen Hydrolasengehalt und Progressivität der Innenohrschwerhörigkeit. Ihr Nachweis, der auf der Verdauung der Gelatine photographischer Filme durch einen Tropfen Perilymphe beruht, ist jedoch nur semiquantitativ auswertbar und außerdem relativ unempfindlich. Die Reinheitskontrolle erfolgte nur mikroskopisch auf den Gehalt an Zellen. Zwar gelang es CAUSSE et al. 1974 und CHEVANCE et al. 1976, ihre Befunde über die Hydrolasen genauer zu spezifizieren, aber immer noch ohne die Möglichkeit einer echten Kontaminationskontrolle. Über den Nachweis unspezifischer Esterase wird nicht berichtet.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, könnte der von uns entwickelte Esterasenachweis bei gleichzeitiger Kontaminationskontrolle einen interessanten und in dieser Exaktheit bisher nicht möglichen Beitrag liefern zur Theorie der lysosomalen Genese otosklerotischer Innenohrschwerhörigkeit.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine möglichst empfindliche Nachweismethode für unspezifische Esterase zu entwickeln, die auch in so geringen Flüssigkeitsmengen, wie sie z.B. im Innenohr zur Verfügung stehen, noch durchführbar ist.

Nach Vorversuchen mit verschiedenen Substraten und Farbstoffen erwies sich die Kombination von α-Naphthyl-Acetat mit Fast Garnet GBC als die am besten geeignete. Cellulose-Acetat-Folien wurden mit einem diese Substanzen enthaltenden Inkubationsmedium präpariert und danach in einer feuchten Kammer jeweils 0.4 µl einer Esterase-Standardverdünnungsreihe aufgetragen. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Folien in Paraffinum liquidum aufgehellt und die Integrierte Optische Dichte der Farbstoffpunkte mit Hilfe des Fernsehbild-Densitometers Quantimet 720 D bestimmt.

Die obere Begrenzung des Meßbereichs zogen wir bei 1 U/ml, die untere Nachweisgrenze lag bei einer Esterasekonzentration von 0.08 U/ml. Beim Einsatz von 0.4 µl entspricht dies absolut einer Enzymaktivität von 0.032 mU.

Nach Berechnung der linearen Regression zeigte sich innerhalb des gesamten Bestimmungsbereichs ein guter linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Enzymaktivität und entwickeltem Farbstoff bzw. gemessener Integrierter Optischer Dichte. Aus den Mittelwerten der Einzelbestimmungen und deren Standardabweichungen, die nur im unteren Bereich 10% überschritten, ergab sich eine ausreichende Meßgenauigkeit.

Die entwickelte Methode erweist sich somit als hochempfindlicher Nachweis unspezifischer Esterase und als für kleinste Probevolumina geeignet.

6. Literaturverzeichnis

1. Altmann F., M. Kornfeld, J. J. Shea: Inner ear changes in Otosclerosis. Ann. Otol. 75 (1966) 5

2. Altmann F., J.G. Waltner: The circulation of the labyrinthine fluids. Ann. Otol. 56 (1947) 684

3. Ardouin P., R. Wegmann: Perturbations histoenzymologiques au niveau des foyers otospongieux au cours de l'otosclérose évolutive. Rev. Laryng.(Bordeaux) 82 (1961) 465

4. Arnold W.: Veränderungen im Bereich der Mittelohrschleimhaut bei der Otosklerose. Acta Otolaryng. 81 (1976) 185

5. Arnold W., D. Plester: Histologische und klinische Aspekte bei florider Otospongiose der Steigbügelfußplatte mit Beziehung zur Perilymphe. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. 215 (1977) 159

6. Barka T.: A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. Nature 187 (1960) 248

7. Bretlau P.: Otosclerosis. Electron microscopic studies of biopsies from the labyrinthine capsule. Arch. Otolaryng. 93 (1971) 551

8. Burstone M.S.: The cytochemical localisation of Esterase. J. Nat. Cancer Inst. 18 (1957) 167

9. Casorati V.: Su di alcune caratteristiche fisiche e chimiche della perilinfa e del liquor del cavallo. Clin. otorinolaryng. 10 (1958) 398

10. Causse J., L.G. Chevance, G.E. Shambaugh Jr.: Clinical experience and experimental findings with sodium fluoride in Otosclerosis. Ann. Otol. 83 (1974) 643

11. Causse J., L.G. Chevance, P. Bretlau, M.B. Jorgensen, J. Uriel, J. Bergès: Enzymatic concept of Otospongiosis and cochlear Otospongiosis. Clin. Otolaryngol. 2 (1977) 23

12. Chevance L.G., J.Causse, J. Bergès: α_1- Antitrypsin activity of perilymph. Arch. Otolaryng. 120 (1976) 363

13. Chevance L.G., J. Causse, M.B. Jorgensen, P. Bretlau: L'otospongiose, maladie lysosomale, cellulaire et enzymatique. Ann. Oto-Laryng.(Paris) 89 (1972) 5

14. Chevance L.G., J. Galli, P. Jeanmaire: Immunoelectrophoretic study of the human perilymph.Acta Otolaryng. 52 (1960) 41

15. Choudhury S.R.: The nature of nonspecific esterases, a subunit concept. J. Histochem. Cytochem. 20 (1972) 507

16. Fritsch J.H., C.R. Jollif, H.F. Schliesser: Proteins of human perilymph. Ann. Otol. 78 (1969) 888

17. Giebel W.: Proteins and amino acids in inner ear fluids. In: Otorhinolaryngology, Proceedings of the X. World Congress, Arslan M. and V. Ricci eds., Excerpta med. ICS 337 (1974) 790

18. Giebel W.: Quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Pico-Mol-Bereich durch Densitometrie von Mikro-Dünnschicht-Chromatogrammen. In: Fortschritte der quantitativen Bildanalyse, hrsg. von Imanco GmbH, (1975) 295

19. Giebel W.: Habilitationsschrift (eingereicht 1981)

20. Giebel W., T. Keppeler: Quantitative determination of serum proteins in guinea pig perilymph obtained by different preparation methods. In: Les Colloques de l'Institut National de la Santé et de la

Recherche Médicale: Biologie de l'oreille interne, hrsg. von M. Portmann und J.-M. Aran, INSERM, 68 (1977) 301

21. Giebel W., H. Saechtling: A combination of micro-disc-electrophoresis with antigen-antibody crossed electrophoresis. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 673

22. Giebel W., F. Scheibe: Mikroflammenphotometrische Natrium - Kaliumbestimmung zur Reinheitskontrolle von Innenohrflüssigkeiten. Arch. Otorhinolaryngol. 234 (1982) 45

23. Giebel W., H.-M. Striebel: Interne Standards zur Fehlerkorrektur bei Densitometrie von Dünnschicht-chromatogrammen. Microsc. acta, Suppl 1 (1977) 133

24. Gomori G.: The histochemistry of esterases. Internat. Rev. Cytol. 1 (1952) 335

25. Gomori G., R.D. Chessick: Histochemical studies of the inhibition of esterases. J. cell. comp. Phys. 41 (1953) 51

26. Hladky R., R. Brada, S. Kočent: Versuch einer biochemischen Biopsie der Perilymphe bei operierten Otosklerose-Kranken. Acta Otolaryng. 51 (1960) 424

27. Kleinschmidt E.-G., U. Vick: Proteinstudie zur Frage der Perilymphsubstitution durch Liquor cerebrospinalis via Aquaeductus cochleae. Acta Otolaryng. 82 (1976) 99

28. Kucharz E., M. Drożdż: The role of lysosomes in the diseases of connective tissue. A review. Folia Histochem. Cytochem. 15 (1977) 63

29. Lim D.J., W. H. Saunders: Active otosclerotic foci in the stapes. Acta Otolaryng. 80 (1975) 255

30. Palva T., V. Raunio, R. Forsén: Esterases in post mortem inner ear fluids. Acta Otolaryng. 71 (1971) 140

31. Peterson S.K., L.S. Frishkopf, C. Lechêne, C.M. Oman, T.F. Weiss: Element composition of inner ear lymphs in cats, lizards and skates determined by electron probe microanalysis of liquid samples. J. comp. Physiol. 126 (1978) 1

32. Rauch S.: Biochemie des Hörorgans. Thieme, Stuttgart 1964

33. Rauch S., D. Plester: Untersuchung der Perilymphe stapedektomierter Otosklerosen auf einige Elektrolyte, Enzyme und Eiweisse und ihre Beziehung zum Hörverlust. Méd. et Hyg. 23 (1965) 984

34. Ruedi L., M.C. Sanz, U. Fisch: Untersuchungen der Perilymphe nach Stapedektomie in Otosklerosefällen. Acta Otolaryng. 59 (1965) 291

35. Scheibe F., Diezel, H. Haupt, U. Hache: Elektrophoretische Untersuchung zur Proteinverteilung in der Meerschweinchen-Perilymphe. Acta Otolaryng. 81 (1976) 68

36. Schindler K., E.A. Schnieder: Perilymph in patients with Otosclerosis. Arch. Otolaryng. 84 (1966) 37

37. Schuknecht H.F., C.W. Gross: Otosclerosis and the inner ear. Ann. Oto.Rhino.Laryng. 75 (1966) 423

38. Siebenmann F.: Multiple Spongiosierung der Labyrinthkapsel als Sectionsbefund bei einem Fall von progressiver Schwerhörigkeit. Z. Ohrenheilk. 34 (1899) 356

39. Silverstein H.: Biochemical studies of the inner ear fluids in the cat. Preliminary report. Ann Otol. 75 (1966) 48

40. Silverstein H.: Inner ear fluid proteins in acustic neuroma, Menière's disease and otosclerosis. Ann. Oto. Rhino. Laryng. 80 (1971) 27

41. Silverstein H.: The inner ear fluid in man. Laryngoscope 82 (1972) 79

42. Silverstein H.: The collection and microanalysis of inner ear fluid. In: Handbook of auditory and vestibular research methods, C.A. Smith and I.A. Vernon eds., Charles C. Thomas, Springfield 1976

43. Südhof H., E. Wötzel: Über die Haltbarkeit von zur Enzymaktivitätsbestimmung vorgesehenen Serumproben. Klin. Wschr. 38 (1960) 1165

44. Uriel J.: Characterization of enzymes in specific immune precipitates. Ann. N.Y. Acad. Sc. 103 (1963) 956

45. Wullstein H.L., W. Kley, S. Rauch, A. Köstlin: Zur Biochemie der Perilymphe operierter Otosklerosen. Z. Laryng. Rhinol. 39 (1960) 665

7. Anhang

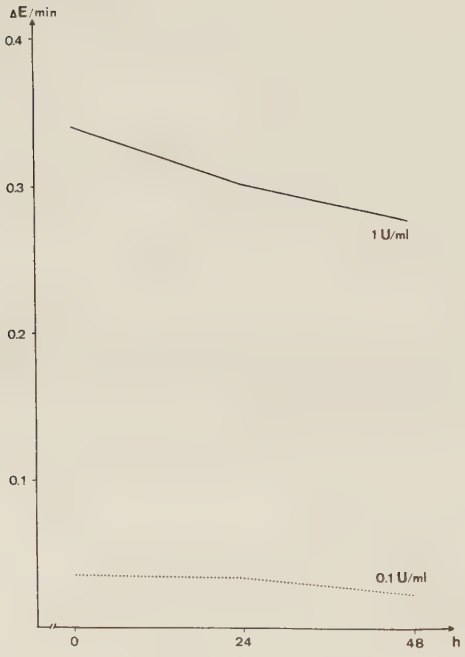

Abb. 1: Alterung einer mit 1/15 M Phosphatpuffer pH 6.5 angesetzten Standardverdünnungsreihe unspezifischer Esterase.

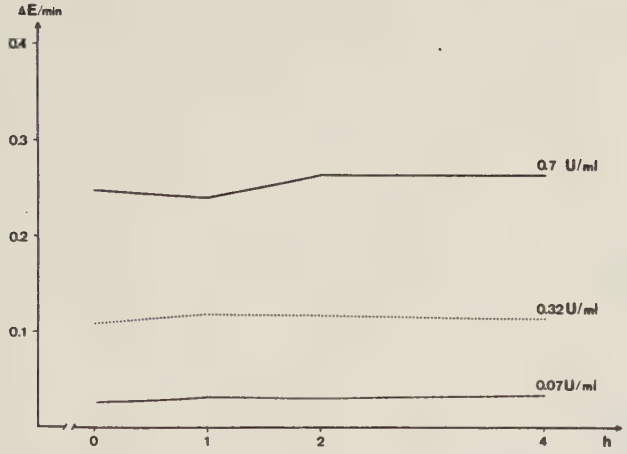

Abb. 2: Alterung bei Ansatz der Verdünnungsreihe mit 10^{-2}-facher Pufferkapazität bei pH 7.4

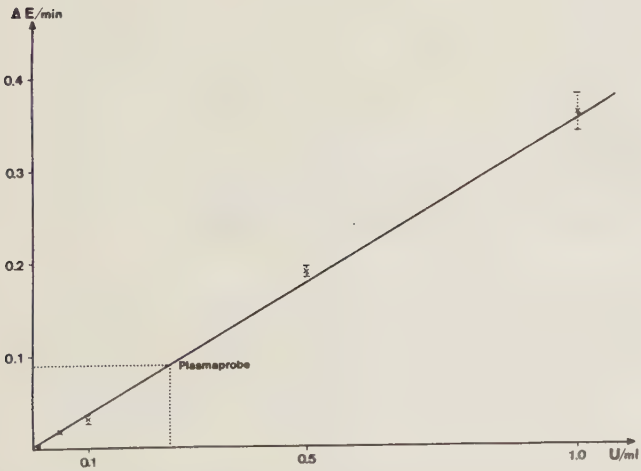

Abb. 3: Regressionsgerade aus dem Küvettentest

Abb. 4: Integrierte Optische Dichte (IOD) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

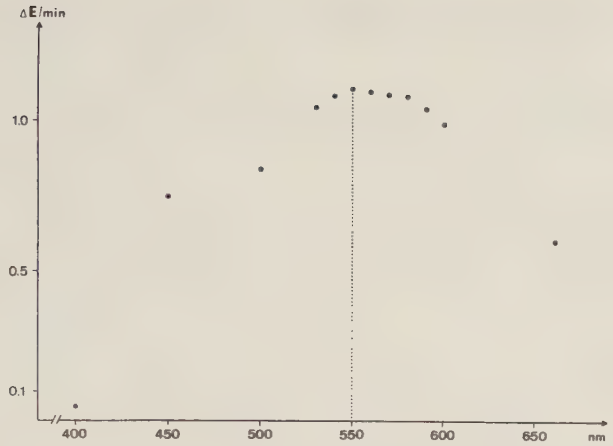

Abb. 5: Absorptionskurve des Azofarbstoffes

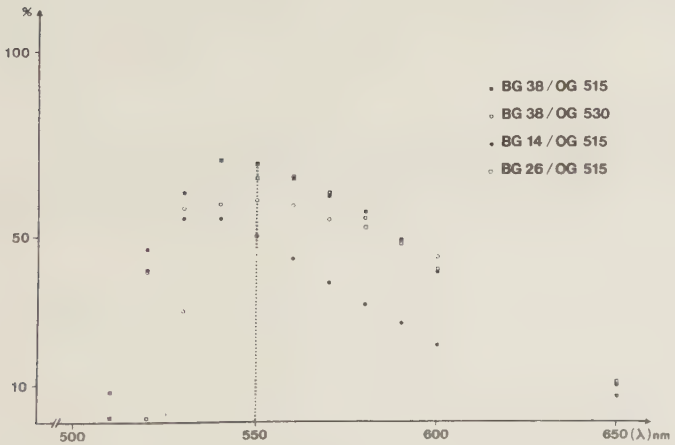

Abb. 6: Transmissionen verschiedener Filterkombinationen

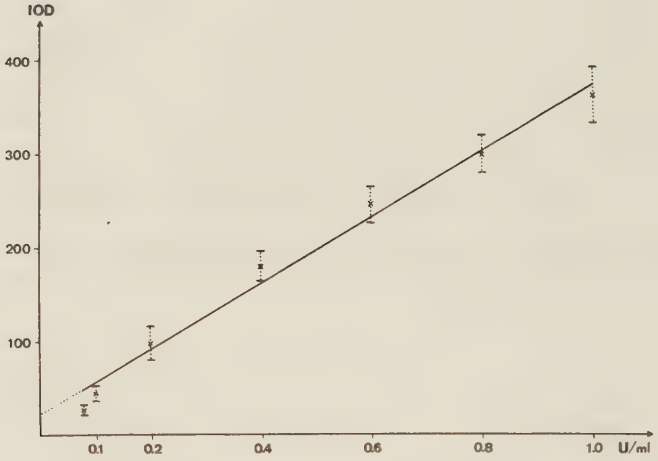

Abb. 7: Integrierte Optische Dichte (IOD) in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymaktivität. Eichkurve der Nachweisreaktion für unspezifische Esterase.

Lebenslauf

Am 19.12.1955 wurde ich in Stuttgart als Tochter von Dr.-Ing. Paul Strifler und seiner Frau Inge, geb. Schmidt, geboren.

1962 Einschulung in die Grundschule Kornwestheim

Ab 1966 Besuch des Ludwig-Uhland-Gymnasiums in Kirchheim unter Teck

1974 Reifeprüfung und Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes

Ab 1974 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1978 Erste Ärztliche Prüfung

1980 Zweite Ärztliche Prüfung, danach Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart

1981 Dritte Ärztliche Prüfung, schriftlicher Teil am 7.4.81 in Tübingen, mündlicher Teil am 9.4.81 in Stuttgart

Seit 1981 verheiratet mit Lutz Binder

Zur Zeit bin ich im Rahmen der Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin im Städtischen Klinikum Braunschweig als Assistenzarzt tätig.

Druck Köhler Tübingen